

How the renin angiotensin system influences the cardiac matrix via transforming growth factor β [Beta] signaling

Citation for published version (APA):

Pokharel, S. (2004). How the renin angiotensin system influences the cardiac matrix via transforming growth factor β [Beta] signaling. Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2004

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Introduction

Hypertensive hearts adapt to an increased workload by cardiac increasing the size of myocytes and altering the levels and composition of matrix. However, these initial adaptive changes can ultimately contribute to cardiac dysfunction, which is often characterized by excess cardiac collagen deposition. It is probably extravagant that pressure-overloaded ventricles, where myocytes are growing to cope with the increased workload, generate excess collagen. Excess collagen renders the ventricles stiffer and heterogeneous, thus increasing the propensity to develop arrhythmias. So the question arises why and under what mechanisms the excess collagen is formed in a pressure loaded heart. Answers to these questions may help to design a rational way to prevent or inhibit adverse accumulation of collagen in the heart. A central concept is that activation of the rennin angiotensin system (RAS) is a universal accompaniment to cardiac fibrosis and ventricular dysfunction. This thesis was based on the hypothesis that an activated RAS initiates signaling events in cardiac fibroblasts that leads to increased cardiac collagen, and that interruption of this signaling can *selectively* halt collagen formation and/or hypertrophy. This hypothesis predicts that selective signaling cascades exist that regulate either myocyte hypertrophy or collagen synthesis, so that a particular pathway can be targeted to specifically inhibit hypertrophy or fibrosis.

Chapter 1 comprises the **general introduction** to the thesis and the historical remarks on RAS and TGF β 1 system. This provides an overview on the impact of cardiac fibrosis on ventricular function, role of RAS and the contribution from its stimulatory (e.g. Ang II) and inhibitory (e.g. AcSDKP) players on cardiac remodeling. It further underscores the effects of TGF β 1 signaling system on cardiac fibrosis.

Chapter 2 gives a brief summary of the **molecules that are involved in cardiac hypertrophy** and focuses on factors that lead to transition from compensatory hypertrophy to maladaptive state. Based on the existing body of literature, role of TGF β 1/Smad signaling is highlighted.

In Chapter 3, we studied the **molecular changes resulting from high cardiac Ang II**. The Homozygous variant of the transgenic rats over-expressing renin TGR(mRen2)27 had hypertension, LV hypertrophy, excessive myocardial fibrosis and impaired LV function. At the second messenger level, both Smad2 and ERK 42/44 were activated. Inhibition of either Smad2 or ERK

phosphorylation by losartan and tyrphostin, respectively, abolished myocardial remodeling and improved LV performance. This suggests that cross-talk and co-ordinated action between these signaling pathways is mandatory for Ang II-induced ventricular remodeling and blockade of either of the signaling arms is sufficient to prevent the adverse effects.

AcSDKP is a novel peptide linked to the RAS and cellular growth. When the work for this thesis was initiated, very little was known about the function of AcSDKP in cardiac biology. The only known function of AcSDKP was that it is a negative regulator of the growth of hematopoietic stem cell progenitors. We presumed that a reciprocal regulation normally exists between the growth stimulators and inhibitors to ensure a balanced equilibrium to maintain the normal steady state in organ structure. A relative excess of stimulators, due to a paucity of inhibitors, creates a state favorable to tissue growth, which, if persistent, may lead to pathologic structural remodeling of the heart. Since AcSDKP, a peptide that depends exclusively on ACE for its degradation, inhibits hematopoietic cells proliferation, we hypothesized that AcSDKP is a negative regulator of cardiac fibrosis.

In Chapter 4, we studied the effects of AcSDKP on the cell-cycle of cardiac fibroblasts. We established that AcSDKP exerts its effects by inhibiting phosphorylation and nuclear translocation of Smad2. **In chapter 5, we established the importance of AcSDKP in counteracting fibrosis induced by ACE.** Generating transgenic rats over-expressing ACE selectively in the heart, we studied their phenotype with and without ACE inhibitor, lisinopril. We demonstrated that levels of cardiac AcSDKP correlated inversely with the ACE expression profile and that a reciprocal relationship exists between the levels of AcSDKP and cardiac collagen content. In search of the underlying mechanism that could explain this phenotype, we found that phosphorylation of Smad2 and Smad3 was increased in ACE-transgenic rats depending on the ACE-gene dose. Despite increased phosphorylation of Smad2/3, TGF β 1 mRNA was not upregulated in ACE-transgenic rats. Competition ligand binding assay demonstrated that AcSDKP does not compete with TGF β 1 for its receptor binding. In cultured cardiac fibroblasts, AcSDKP was able to inhibit TGF β 1 induced Smad3 phosphorylation within 60 minutes, which indicated that AcSDKP inhibits Smad phosphorylation directly at intracellular level.

Having identified TGF β 1/Smad signaling cascade as a central mediator of cardiac remodeling, we hypothesized that targeted deletion of TGF β 1 signaling in myocardium renders hearts resistant to remodeling induced by Ang II. In **chapter 6**, we generated mice where a conditional Cre/LoxP system would be induced by tamoxifen to inactivate the gene for TGF β 1 type I receptors specifically in cardiac myocytes. The system was induced in the mice older than 10-weeks so that the embryonic or early postnatal effects of the loss of cardiac TGF β 1 type I receptors would be circumvented. This showed that **mice deficient of TGF β 1 type I receptors specifically in cardiomyocytes were resistant to Ang II induced cardiac hypertrophy and dysfunction**. This was accompanied by failure of P38 MAPK activation, while SMAD signaling remained unchanged. We concluded that TGF β receptor-coupled P38 activation in cardiomyocytes is essential for Ang II-induced cardiac hypertrophy.

Although long standing hypertension or pressure overload can lead to activation of RAS, it was not clear whether mechanical stretch alone is able to trigger a signal to initiate fibrosis. In **chapter 7**, we utilized an equi-biaxial stretch system and studied the **effects of passive stretch on cardiac fibroblasts** grown in collagen coated silastic membranes. We demonstrated that mechanical stretch induced the release of a potent fibrotic mediator, CTGF, as early as 3 hours following stretch stimulus via EGF-receptor coupled β 1 integrin signaling.

In conclusion, this thesis unravels how RAS activation is translated to untoward cardiac effects, and demonstrates an unsuspected and novel mechanism of action for the long known enzyme ACE. Many effects of Ang II are mediated via TGF β system, where the effects on fibroblasts are due to recruitment of Smads, while we show direct evidence that the effects in myocytes are primarily due to recruitment of P38 MAPK. Surprisingly, ACE again plays a major role in this system, not by its Ang II generating capacity, but rather by its breakdown of AcSDKP, which we show to be an important inhibitor of Smad signaling, so that an increase in ACE results in the loss of this beneficial inhibitor. Since these signaling cascades have been previously described to be active in various types of cancer, the recent development of drugs intervening in these cascades opens novel possibilities beyond cancer treatment, so that the knowledge gathered above can help to choose the most appropriate of these newly developed inhibitors to target cardiac hypertrophy, fibrosis or both.

Samenvatting

Inleiding

Een hart dat blootgesteld wordt aan hoge bloeddruk, past zich aan deze verhoogde belasting aan door vergroting van de hartspiercellen (hypertrofie) en door het veranderen van de samenstelling van de extra-cellulaire matrix. Deze initiële nuttige aanpassingen zullen echter uiteindelijk leiden tot disfunctioneren van het hart, wat dikwijls gepaard gaat met een overmatige collageen depositie in het hart. De hoeveelheid collageen die de ventrikels produceren in reactie op druk-overbelasting, waarbij de hartspiercellen groeien om deze verhoogde belasting aan te kunnen, is waarschijnlijk te overvloedig. Deze enorme hoeveelheid collageen maakt de ventrikels stijver en door de heterogene verdeling ervan wordt de kans op arrhythmieën verhoogd. De belangrijkste vragen zijn dus waarom en door welk mechanisme deze enorme hoeveelheid collageen wordt gevormd in reactie op druk-overbelasting van het hart. De antwoorden op deze vragen zouden kunnen helpen om op een rationele manier de ongewenste opstapeling van collageen in het hart te voorkomen of te blokkeren. Centraal concept hierbij is dat het renine angiotensine systeem (RAS) altijd geactiveerd wordt tijdens de vorming van cardiale fibrose en tijdens het optreden van ventrikel disfunctie. In deze dissertatie staat de hypothese centraal dat activatie van het RAS signalering initieert in cardiale fibroblasten leidend tot verhoogde hoeveelheden collageen in het hart en dat onderbreking van deze signalen *selectief* een halt kan toeroepen aan de collageenvorming en/of hypertrofie. Deze hypothese voorspelt dat er selectieve signaalcascades bestaan die of de hartspiercelgroei of de collageen synthese reguleren, zodat deze cascades als doelwit kunnen dienen om specifiek de hypertrofie of fibrose tegen te gaan.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding voor deze dissertatie, waarin enkele historische feiten over het RAS en TGF β 1 systeem worden vermeld. Hierin wordt een overzicht gegeven van de impact van cardiale fibrose op ventrikel functie en over de rol van RAS, en de bijdrage van stimulatie (bv. d.m.v. Ang II) en inhibitie (bv. d.m.v. AcSDKP) op remodelering van het hart. Tevens wordt het belang van de effecten van het TGF β 1 signaalsysteem op cardiale fibrose beschreven.

Hoofdstuk 2 geeft een korte samenvatting van de moleculen die betrokken zijn bij cardiale hypertrofie, en richt zich met name op de factoren die betrokken zijn bij de overgang van

gecompenseerde hypertrofie naar decompensatie en hartfalen. Gebaseerd op bestaande literatuur wordt de rol van TGF β 1/Smad signalering toegelicht.

In hoofdstuk 3 worden de moleculaire effecten van verhoogd cardiaal Ang II bestudeerd. De homozygote variant van de transgene rat TGR(mRen2)27, die het renine 2 gen tot overexpressie brengt, ontwikkelde hypertensie, linker ventrikel hypertrofie, overmatige myocardfibrose en linker ventrikel disfunctie leidend tot hartfalen. Op het second messenger niveau waren zowel Smad2 als ERK 42/44 geactiveerd. Inhibitie van fosforylatie van Smad2 of ERK door respectievelijk losartan of tyrfostin voorkwam myocardiale remodelering en verbeterde de linker ventrikel functie. Dit suggereert dat crosstalk en gecoördineerde samenwerking tussen deze twee signaalcascades noodzakelijk is voor Ang II geïnduceerde ventriculaire remodelering. Blokkering van één van deze signaalcascades is voldoende om de ongunstige effecten te voorkomen.

AcSDKP is een nieuw peptide dat een rol speelt in RAS en bij cellulaire groei. Bij de start van dit onderzoek was er weinig gekend over de functie van AcSDKP in het hart. De enige bekende eigenschap van AcSDKP was dat het een negatieve regulator was van de groei van hematopoïetische stamcellen. Wij veronderstelden dat er gewoonlijk een wederzijdse regulatie bestaat tussen groei stimulators en remmers om een uitgebalanceerd evenwicht te verzekeren waardoor de normale steady-state toestand in orgaanstructuren wordt gehandhaafd. Een relatief surplus van stimulators, door een gebrek aan remmers, creëert een ideale conditie voor weefselgroei welke, indien continu aanwezig, kan leiden tot pathologische structurele remodelering van het hart. Omdat AcSDKP, een peptide dat uitsluitend gemetaboliseerd wordt door ACE, de hematopoïetische celproliferatie inhibeert, is onze hypothese dat AcSDKP een negatieve regulator is van cardiale fibrose.

In hoofdstuk 4 werden de effecten van AcSDKP op de celcyclus van cardiale fibroblasten bestudeerd. Wij toonden aan dat AcSDKP werkt door middel van remming van de fosforylatie en het nucleair transport van Smad2. **In hoofdstuk 5** bewezen we het belang van AcSDKP om ACE geïnduceerde fibrose tegen te gaan. We genereerden transgene ratten die ACE selectief in het hart tot overexpressie brengen, en bestudeerden hun fenotype in aan- of afwezigheid van de ACE-remmer lisinopril. Wij toonden aan dat de AcSDKP spiegels *invers gecorreleerd* zijn met ACE expressie en dat er een wederzijdse relatie bestaat tussen de AcSDKP concentratie en cardiale hoeveelheid collageen. Op zoek naar het onderliggende mechanisme dat dit fenotype kon verklaren,

vonden we dat de fosforylatie van Smad2 en Smad3 toegenomen was in ACE transgene ratten waarbij de stijging afhankelijk was van de ACE-gen dosis. Ondanks de verhoogde fosforylatie van Smad2/3 was het TGF β 1 mRNA niet upgereguleerd in ACE transgene ratten. Een competitie-ligand bindingsstudie toonde aan dat AcSDKP niet in competitie treedt met TGF β 1 voor de binding van TGF β 1 aan zijn receptor. In gekweekte cardiale fibroblasten was AcSDKP in staat om TGF β 1 geïnduceerde fosforylatie van Smad3 te inhiberen binnen één uur, wat aangaf dat AcSDKP op een directe manier de Smad fosforylatie inhibeert op een intracellulair niveau.

De identificatie van de TGF β 1/Smad signaalcascade als centrale mediator van cardiale remodelering, bracht ons tot de hypothese dat onderbreking van het TGF β 1 signaal specifiek in de cardiomyocyten het hart resistent maakt tegen Ang II geïnduceerde remodelering. **In hoofdstuk 6** genereerden we muizen die na inductie met Tamoxifen door een conditioneel Cre/LoxP systeem het gen voor de TGF β 1 type I receptor inactiveerden, specifiek in de hartspiercellen. Dit systeem werd geïnduceerd in muizen ouder dan 10 weken om zo de embryonale of vroeg postnatale effecten die door het verlies van de TGF β 1 type I receptor in het hart zouden kunnen optreden te omzeilen. Wij vonden dat muizen die de TGF β 1 type I receptor specifiek missen in cardiomyocyten, resistent waren tegen Ang II geïnduceerde cardiale hypertrofie en disfunctie. Dit ging samen met het falen van de p38 MAPK activatie, terwijl de Smad signaaltransductie onveranderd bleef. Wij concludeerden dat de TGF β receptor gekoppelde p38 activatie in cardiomyocyten essentieel is voor Ang II geïnduceerde cardiale hypertrofie.

Ondanks dat hypertensie of druk-overbelasting kan leiden tot de activatie van RAS, was het nog niet duidelijk of mechanische stretch alleen voldoende is om een signaal te initiëren dat leidt tot fibrose. **In hoofdstuk 7** gebruikten we een equi-bi-axiaal stretch systeem en bestudeerden de effecten van passieve stretch op cardiale fibroblasten, die in met collageen gecoate siliconenmembranen opgegroeid waren. Wij toonden aan dat mechanische stretch de excretie van de potente fibrotische mediator CTGF induceerde, reeds na 3 uur van de stretch stimulus, via EGF-receptor gekoppelde β 1 integrin signalering.

Concluderend ontrafelt deze dissertatie hoe RAS activatie vertaald wordt naar cardiale effecten en toont ze een onverwachte, nieuwe werking en mechanisme van het lang gekende ACE enzym. Veel effecten van Ang II worden gemedieerd door het TGF β systeem. In fibroblasten worden de effecten

van Ang II gemedieerd via TGF β afhankelijke Smad activatie. In cardiomyocyten daarentegen tonen wij aan dat de effecten van Ang II voornamelijk het gevolg zijn van activatie van p38 MAPK. Tot onze verrassing bleek ACE ook in dit systeem een belangrijke rol te spelen, echter niet door de Ang II generende eigenschap, maar eerder door afbraak van AcSDKP. Wij tonen aan dat AcSDKP een belangrijke remmer is van Smad activatie, zodat een stijging in ACE resulteert in een afname van deze heilzame remmer. Omdat eerder beschreven is dat deze signaalcascades geactiveerd worden bij verschillende vormen van kanker, opent de recente ontwikkeling vangeneesmiddellen die ingrijpen in deze cascades nieuwe mogelijkheden voor behandeling die verder strekken dan de behandeling van kanker alleen. Hierdoor zal de door deze dissertatie opgeleverde kennis van de signaalcascades in het hart helpen om de juiste van deze nieuwe ontwikkelde remmers te kiezen om cardiale hypertrofie, fibrose of beiden tegen te gaan.